

**EINE BIOLOGISCHE FUNKTION
HYDRIERTER PTERINE IM
BAKTERIELLEN ELEKTRONENTRANSPORT**

Gert Heinz

1975



EINE BIOLOGISCHE FUNKTION HYDRIERTER PTERINE

IM BAKTERIELLEN ELEKTRONENTRANSPORT

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Gert Heinz

aus

Klagenfurt (Österreich)

1974



1. Referent: Professor Dr. H. Rembold
 2. Referent: Professor Dr. F. Lynen
- Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.1975

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in München unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Rembold durchgeführt.

Herrn Dr. A. Kröger bin ich für einige anregende Diskussionen zu Dank verpflichtet.

Besonders herzlich danke ich Herrn Professor Dr. H. Rembold, der mich durch zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
I. <u>Isolierung der Pteridine aus E. coli</u>	6
1. Methoden zur Isolierung unkonjugierter Pteridine	6
2. Gewinnung des Extrakts	7
3. Chromatographie des E. coli-Extrakts	7
3.1. Standard-Chromatographie auf Dowex 1X8	7
3.2. Chromatographische Feinreinigung der Fraktionen des Standardchromatogramms	9
4. Identifizierung der Pteridine aus E. coli	11
5. Bestimmung der optischen Konfiguration des E. coli-Neopterins	12
5.1. Vergleich threo- und erythro-Neopterin	12
5.2. Absolute Konfiguration des E. coli-Neopterins	13
6. Diskussion	14
6.1. L-threo-Neopterin als Hauptpterin von E. coli	14
6.2. Vorkommen von Pteridinen in Mikroorganismen	16
II. <u>Tetrahydropterine als Elektronenmediatoren in E. coli</u>	22
1. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung bei Bakterien	22

2. Isolierung der cytoplasmatischen Membran	24
3. Untersuchung der Cytochromreduktion durch 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8- tetrahydropteridin mit Hilfe der Differenz- spektroskopie	26
4. Atmungsmessungen mit der Sauerstoffelektrode	30
4.1. Hemmung durch Inhibitoren der Atmungskette	32
5. Oxidative Phosphorylierung und Tetrahydro- pterin als Atmungssubstrat	33
6. Aktiver Transport von Aminosäuren mit 6,7- Dimethyltetrahydropterin als Energieliefer- anten	38
7. 6,7-Dimethyltetrahydropterin als Atmungs- substrat bei Membranvesikeln von E. coli	39

<u>Diskussion</u>	41
-------------------	----

<u>Zusammenfassung</u>	45
------------------------	----

<u>Experimenteller Teil</u>	48
-----------------------------	----

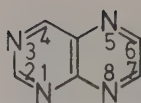
1. Säulenchromatographie	48
1.1. Dowex 1X8	48
1.2. Phosphocellulose	49
1.3. ECTEOLA-Cellulose	49
2. Spektroskopie	49
2.1. Differenzspektren	49
2.2. Bestimmung des optischen Drehwerts	50
2.3. Fluoreszenzmessung	51
3. Atmungsmessungen	51
4. Messung der oxidativen Phosphorylierung	51
4.1. Enzymatische ATP-Bestimmung	51

4.2. ATP-Bestimmung durch Inkubation mit $^{32}\text{P}_i$	52
5. Bestimmung des aktiven Transports	52
6. Präparationen aus E. coli	53
6.1. Präparation der kleinen Partikel	53
6.2. Präparation des Kopplungsfaktors	54
6.3. Präparation der Membranvesikel	54
<u>Literaturverzeichnis</u>	56

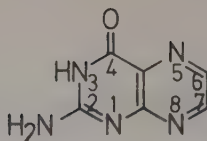
Einleitung und Problemstellung

Die Pteridinchemie begann mit den Untersuchungen von Hopkins über die Farbstoffe der Schmetterlingsflügel am Ende des vorigen Jahrhunderts (1). Diese Arbeiten wurden von Wieland nach fast dreißigjähriger Unterbrechung wieder aufgenommen. Wieland und Schöpf isolierten aus den Flügeln des Zitronenfalters das gelbe und aus den Flügeln des Kohlweißlings das farblose Pigment. Bei der Konstitutionsaufklärung der beiden Verbindungen, Xanthopterin (2) und Leukopterin (3), traten unerwartet große Schwierigkeiten auf. Erst 1940, nach fünfzehnjährigen Untersuchungen, konnte R. Purrmann (4) die Struktur des heterocyclischen Grundkörpers dieser Verbindungsklasse, das Pyrimido-[4.5-b]-pyrazin, aufklären.

H. Wieland, der als Vater der Chemie dieser neuen Stoffklasse gilt, gab ihm den Namen Pteridin. Der Name Pterin, ursprünglich eine Bezeichnung für in struktureller Hinsicht völlig verschiedene Schmetterlingspigmente, blieb künftig dem in 2-Stellung durch eine Aminogruppe und in 4-Stellung durch eine Hydroxygruppe substituierten Grundkörper vorbehalten.



Pteridin



Pterin

Man unterscheidet ferner die Folsäure und ihre Abkömmlinge als "konjugierte" von den "unkonjugierten Pterinen", welche alle anderen Pterine umfassen.

Wie sich bald zeigte, ist die biologische Bedeutung der Pteridine nicht auf ihre Rolle als Insektenfarbstoffe beschränkt. Im Gegenteil: nur ganz wenige Schmetterlinge lagern Pteridinpigmente ab (5). Die meisten gelben und braunen Flügelfarbstoffe gehören vielmehr zur Klasse der Ommochrome (6).

Cowperthwaite wies in Leberextrakten einen neuen Wirkstoff nach, der für das Wachstum des Flagellaten Crithidia fasciculata von essentieller Bedeutung ist (7). Nach Ausarbeitung eines biologischen Tests gelang es 1956 Patterson und Mitarbb., diesen "Crithidiafaktor" aus Menschenharn zu isolieren und seine chemische Struktur zu ermitteln (8). Die "Biopterin" genannte Substanz ist ein Pterin, das in 6-Stellung eine L-erythro-1',2'-Dihydroxypropyl-Seitenkette hat. Die erstaunliche Vitaminaktivität bei Crithidia - der Flagellat wächst bei 10^{-2} ng Biopterin/ml halboptimal (9) - und die weite Verbreitung im Tierreich deuten

auf eine allgemeine biologische Funktion des Biopterins hin. Durch den Nachweis, daß Tetrahydrobiopterin der natürliche Cofaktor der Rattenleberphenylalaninhydroxylase ist, war von Kaufman erstmals die biologische Funktion eines unkonjugierten Pteridins nachgewiesen worden (10). Auch die Pseudomonas-Phenylalaninhydroxylase benötigt reduzierte Pterine als Cofaktor. Das Hauptpterin dieses Organismus ist das 6-(L-threo-1',2',3'-trihydroxypropyl)-Pterin (L-threo-Neopterin) (11). Ferner wurde hydriertes Pterin als Cofaktor der Tyrosinhydroxylase in Rinder-Nebennierenmark nachgewiesen. Das Enzym katalysiert die Hydroxylierung des Tyrosins in 4- Stellung zu DOPA (12). Ein aus Ratteleber präpariertes Enzym, welches langkettige Glycerinäther in Fettsäuren und Glycerin spaltet, benötigt ebenfalls reduziertes Pterin als Cofaktor (13). Eine Reihe weiterer Enzymreaktionen wird durch reduzierte Pterine deutlich stimuliert. Es handelt sich dabei um die Tryptophanhydroxylase (14), die Zimtsäurehydroxylase (15), die Anthranilsäurehydroxylase (16), die Prostaglandinsynthetase (17) und die Alkoholdehydrogenase aus Pseudomonas sp. (18). Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß der Biopterinbedarf des Flagellaten Crithidia fasciculata durch die erwähnten hydroxylierten Verbindungen zwar reduziert, nicht aber aufgehoben wird. Biopterin hat also offensichtlich

noch andere Stoffwechselfunktionen.

So scheinen Tetrahydropterine auf Grund ihres günstig gelegenen Redoxpotentials ($E'_0 = +0,15 \text{ V}$) und ihrer Fähigkeit, leicht ein Radikal zu bilden, eine Rolle im zellulären Elektronentransport zu spielen (19,20). Fuller und Nugent vermuteten, daß Pterine bei der Photosynthese das primäre Redoxsystem bilden, das durch Lichtquantenaufnahme auf ein höheres Energieniveau angehoben wird und dann seine Elektronen auf Ferredoxin übertragen kann (21). Die Tatsache, daß sich in Spinat keine Pterine nachweisen ließen (22), widerspricht allerdings dieser Annahme. Auch das sehr negative Redoxpotential des Ferredoxins ($E'_0 = -0,43 \text{ V}$) spricht gegen die Rolle eines Pterins als primärem Elektronenakzeptor. Bei der mitochondrialen Atmung liegen die Verhältnisse dagegen wesentlich klarer. Hier entspricht dem Redoxpotential des Tetrahydropterins eine Stellung zwischen den Cytochromen b ($E'_0 = +0,04 \text{ V}$) und c_1 ($E'_0 = +0,22 \text{ V}$). Radioaktives Biopterin und Neopterin werden bei Insekten in vivo bevorzugt in die mitochondrienreiche Flugmuskulatur eingebaut (23). Rembold und Buff zeigten, daß Tetrahydropterine durch die mitochondriale Atmungskette veratmet werden, wobei die Elektronen auf das Cytochrom c übertragen werden (24). Ein lösliches Elek-

tronentransportsystem, bestehend aus NADPH, Cytochrom c und Cytochromoxidase konnte durch Zusatz von instabilem Dimethyldihydropterin zum Atmen gebracht werden (24). Damit ist die durch hydriertes Pterin katalysierte Elektronenübertragung von NADPH auf die Cytochrome eindeutig gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob hydrierte Pterine auch im bakteriellen Elektronentransport eine Rolle spielen. Es wurde das Bakterium Escherichia coli auf seinen Pteridingehalt untersucht. Anschließend wurden mit 6,7-Dimethyltetrahydropterin als einfach zu handhabender Modellsubstanz die Untersuchungen am Elektronentransportsystem von E. coli durchgeführt.

I Isolierung der Pteridine aus E. coli

1. Methoden zur Isolierung unkonjugierter Pteridine

Pteridine lassen sich aus biologischen Material entweder mit Wasser, eventuell unter Zusatz von Ammoniak, oder mit Säure - eventuell unter Zusatz von MnO_2 zur raschen und schonenden Oxidation der hydrierten Pteridine - extrahieren (26). Im nächsten Anreicherungsschritt wird der Rohextrakt entweder mit Aktivkohle, Florisil oder anderen Adsorbentien behandelt, um die Säure und aliphatische Verbindungen abzutrennen, die vom Absorptionsmittel festgehaltenen Pteridine werden dann mit 20 %iger Ammoniaklösung wieder eluiert. Ein anderer Weg führt über die chromatographische Auftrennung des Trichloressigsäureextrakts auf einem starken Anionenaustauscher (Dowex 1X8, HCOO^-) und die anschließende Feinreinigung auf Celluloseaustauschern (27). Im letzten Reinigungsschritt wird oft eine präparative Papier- oder Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

In dieser Arbeit wurden die Bakterien mit 5 %iger Trichloressigsäure unter Verwendung eines hochtourigen

Mixers extrahiert. Ein Zusatz von Chloroform erleichtert das Aufbrechen der Bakterienmembran durch Herauslösen eines Teiles der Lipide. Die Trichloressigsäure läßt sich aus dem Rohextrakt leicht durch Ätherperforation entfernen. Wenn anschließend säulenchromatographisch gearbeitet wird, vermeidet man die verlustreiche Adsorption an Aktivkohle.

2. Gewinnung des Extrakts

3 kg Feuchtmasse von *Escherichia coli* B/X wurde in drei Portionen aufgeteilt und jeweils unter Zusatz von 1 l 5 %iger Trichloressigsäure und 100 ml Chloroform nach folgendem Schema extrahiert (Abb. 1). Die vereinigten wässrigen Extrakte (ca. 9 l) wurden auf etwa 2 l eingeengt und über Nacht mit Äther perforiert, um die Trichloressigsäure quantitativ zu entfernen. Das erhaltene Rohkonzentrat hatte eine schwach gelbe Farbe.

3. Chromatographie des E. coli-Extraktes

3.1. Standard-Chromatographie auf Dowex 1X8

Die chromatographische Auftrennung der Pteridine er-

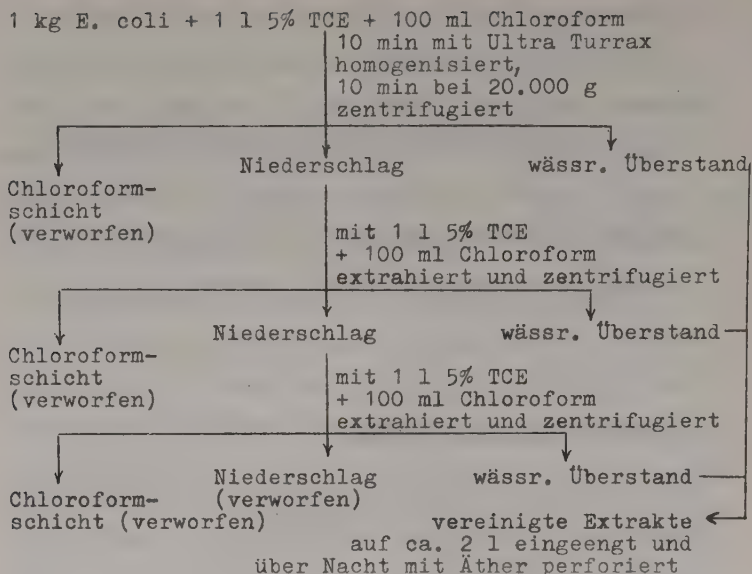


Abb. 1. Aufarbeitungsschema zur Gewinnung eines Rohextraktes aus E. coli. TCE = Trichloressigsäure.

folgte weitgehend nach einer von Rembold und Buschmann ausgearbeiteten Methode (27,28). Der Rohextrakt aus E. coli wurde auf etwa 300 ml eingengt und auf die Dowex 1X8-Standardsäule aufgetragen. Eluiert wurde zunächst mit 2 l Wasser; anschließend wurde eine Gradientenelution mit 0,4 N, 1 N, 2 N und 4 N Ameisensäure, sowie mit 4 N Ameisensäure + 0,2 M Ammonformiat und 4 N Ameisensäure + 3 M Ammonformiat durchgeführt. Ein typisches Standardchromatogramm zeigt die Abbildung 2.

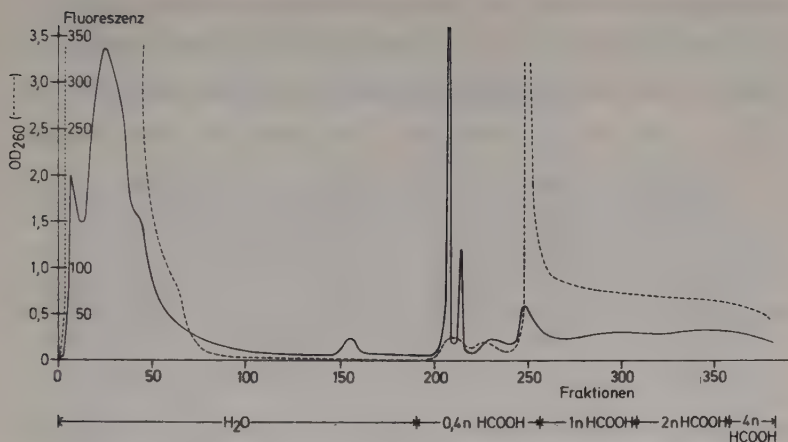


Abb. 2. Standard-Chromatographie des Trichlorsäure-Extraktes aus 1 kg E. coli auf Dowex 1X8 (HCOO^-). Säulenvolumen 140 ml; Fraktionsvolumen 10 ml.
 — Fluoreszenz, ---- E_{260} .

3.2. Chromatographische Feinreinigung der Fraktionen des Standardchromatogramms

Die Feinreinigung des Bereichs, der aus Dowex 1X8 mit Wasser eluiert wird, erfolgt durch eine Rechromatographie auf der Standard-Säule und drei weitere Chromatographien auf Phosphocellulose-Säulen. Hier fallen vor allem die 6-Polyhydroxyalkylpterine an. Nach der ersten Chromatographie auf Phosphocellulose ließ sich kein fluoreszierendes Material abtrennen. Zur weiteren Feinreinigung wurde daher ein anderes Reinheitskriterium

verwendet: Es wurde der Quotient der Extinktionen zwischen einem Maximum (bei 275 nm) und einem Minimum (bei 252 nm) des UV-Spektrums des Polyhydroxyalkylpterins gebildet und mit seinem theoretischen Wert von 2,0 verglichen. Die Abbildung 3 zeigt die Rechromatographie des wässrigen Bereichs aus dem Standardchromatogramm auf der Dowex-Standardsäule und die drei folgenden Reinigungsschritte auf Phosphocellulose.

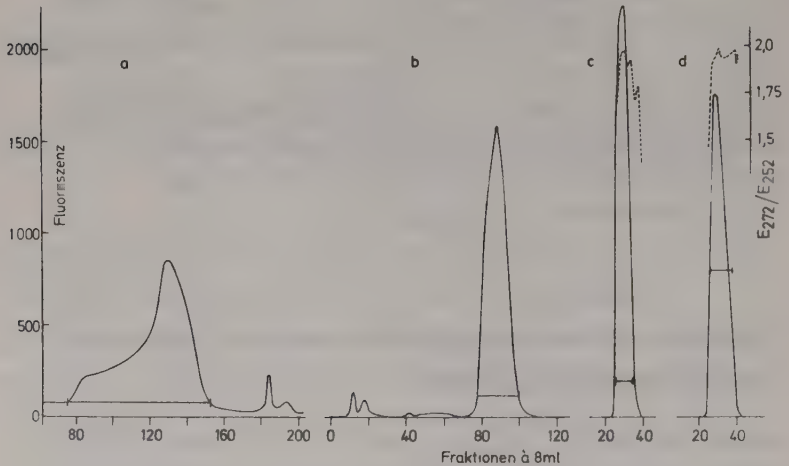


Abb. 3. Rechromatographie des wässr. Bereichs aus dem Standardchromatogramm auf Dowex 1X8 (a) und auf Phosphocellulose (b-d). Säulenvolumina: a = 140 ml, b-d = 30 ml. — Fluoreszenz, ---- E_{275}/E_{252} .

Der mit verdünnter Ameisensäure eluierte Bereich aus dem Standardchromatogramm wurde zunächst mit Äther

perforiert und anschließend ebenfalls auf Phosphocellulose chromatographiert. Man erhält hier schwach saure Pteridine wie Pterin, Lumazin, Xanthopterin und Isoxanthopterin.

Der mit Ameisensäure/Ammonformiat eluierte Bereich wurde stark verdünnt auf eine ECTEOLA-Cellulosesäule aufgetragen und das Ammonformiat durch Nachwaschen mit Wasser abgetrennt. Die Elution erfolgte mit 1 %iger Ameisensäure. Nach dem Perforieren mit Äther wurde als eine weitere Reinigungsstufe noch über Sephadex G-25 chromatographiert. Im mit Ameisensäure/Ammonformiat eluierten Bereich fallen stark saure Pteridinverbindungen wie Carbonsäuren und Phosphorsäureester an.

4. Identifizierung der Pteridine aus E. coli

Für eine gezielte Suche nach Pteridinverbindungen ist die Standardchromatographie auf Dowex 1X8 von besonderem Vorteil, da die Stoffe bei einem genau definierten Retentionsvolumen erscheinen. So wurden im wässrigen Bereich des Standardchromatogramms dünnschicht- und papierchromatographisch Neopterin und 6-Hydroxymethylpterin identifiziert, im mit 0,4 N Ameisensäure eluierten Bereich Pterin, im Bereich der 4 N Ameisensäure Pterin-6-carbonsäure. Nicht gefunden wurden Biopterin, Xanthopterin, Dihydroxanthopterin, Isoxanthopterin, Lumazin

und die Hydroxylumazine. Ebenso wurden keine Phosphorsäureester von Pteridinen nachgewiesen. Auf Grund ihrer intensiven Fluoreszenz hätten sich die nicht gefundenen Pteridine noch in Gammamengen zu erkennen gegeben.

Aus den UV-Daten läßt sich die Neopterinmenge auf 1200 $\mu\text{g/kg}$, die der drei anderen Pterine auf 50 $\mu\text{g/kg}$ Bakterienmasse berechnen. Die Daten sind, zusammen mit den Rf-Werten, in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Aus *Escherichia coli* isolierte Pteridine ($\mu\text{g/kg}$ Feuchtmasse). Laufmittel für die Papierchromatographie: a = n-Butanol/Eisessig/Wasser 20:3:7, b = 3 % wässr. NH_4Cl , c = 4 % wässr. Na-Citrat, d = n-Propanol/1 % wässr. Ammoniak 2:1. Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie: e = Isopropanol/5 % wässr. H_3BO_3 4:1, f = Methanol/Wasser 4:1, g = Dioxan/5 % wässr. Ammoniak 76:24. Papier: Schleicher u. Schüll Nr. 2043 b; Dünnschichtplatten: Merck Nr. 5724.

Pteridin	$\mu\text{g/kg}$	Papier				Dünnschicht		
		a	b	c	d	e	f	g
Neopterin	1200	0,14	0,57	0,53	0,20	0,19	0,51	0,22
Pterin	50	0,28	0,46	0,44	0,29	0,56	0,65	0,40
6-Hydroxymethylpterin	50	0,21	0,48	0,44	0,25	0,59	0,60	0,35
Pterin-6-carbonsäure	50	0,09	0,45	0,40	0,09	0,23	0,61	0,11

5. Bestimmung der optischen Konfiguration des E. coli-Neopterins

5.1. Vergleich threo- und erythro-Neopterin

Die Seitenkette des Neopterins besitzt zwei asymmetri-

sche Kohlenstoffatome. Es sind also vier verschiedene optische Isomere möglich: Die Hydroxylgruppen der Seitenkette können der Erythrose oder der Threose entsprechen. Demgemäß wird von einem "erythro"- bzw. von einem "threo"-Neopterin gesprochen. Beide Formen können wiederum der L- oder der D- Reihe angehören. In ihrem chromatographischen Verhalten unterscheiden sich die jeweiligen D- und L-Isomeren jedoch nicht. Tabelle 2 vergleicht die Rf-Werte von synthetischem threo- bzw. erythro-Neopterin mit dem E. coli-Neopterin.

Tabelle 2. Vergleich der optischen Isomeren des Neopterin mit dem E. coli-Neopterin. Laufmittel für die Papier- und Dünnschichtchromatographie wie in Tabelle 1. h =Dioxan/Eisessig/Wasser 76:12:12.

	Papier				Dünnschicht		
	a	b	c	d	e	f	h
E. coli-Neopterin	0,14	0,57	0,53	0,20	0,19	0,51	0,40
threo-Neopterin	0,14	0,57	0,53	0,20	0,19	0,51	0,40
erythro-Neopterin	0,13	0,60	0,55	0,21	0,26	0,59	0,45

Der papier- und dünnschichtchromatographische Vergleich beweist die threo-Konfiguration des E. coli-Neopterin.

5.2. Absolute Konfiguration des E. coli-Neopterin

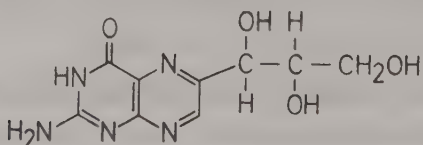
Zur Feststellung des Drehwertes wurde der Naturstoff zweimal aus Wasser umkristallisiert. Der spezifische

Drehwert, der sich aus den Messungen mit einem Cary 60 Spektrometer ergab, berechnete sich zu $[\alpha]_D^{25} = +109 \pm 2^\circ$ (Tab. 3). Bei synthetischen L-threo-Neopterin wurden Drehwerte von $+97^\circ$ (loc. cit. 29) bzw. $+113^\circ$ (loc. cit. 30) gefunden.

Tabelle 3. Vergleich der $[\alpha]_D^{25}$ -Werte von synthetischen Neopterin-Isomeren (29; 30).

Neopterin	$[\alpha]_D^{25} \circ$	c (M) (in 0,1 N HCl)
E. coli-Neopterin	$+109 \pm 2$	0,1
D-erythro	$+45 \pm 3$; $+50 \pm 2$	0,3
L-erythro	-44 ± 3	0,3
D-threo	-92 ± 3	0,3
L-threo	$+97 \pm 3$; $+113 \pm 2$	0,3

Damit ist die L-threo- bzw. 1'(S),2'(R)-Konfiguration der Trihydroxypropylseitenkette des E. coli-Neopterins bewiesen:



6. Diskussion

6.1. L-threo-Neopterin als Hauptpterin von E. coli

Während bei höheren Organismen noch Unklarheit über

die Bildung der 6-Hydroxyalkylpterine besteht, wird für Mikroorganismen Guanosintriphosphat als Vorstufe postuliert. Tatsächlich wurden entsprechende Enzyme aus E. coli (31), Comamonas sp. (32) und L. plantarum (33) angereichert. Während E. coli 7,8-Dihydro-D-erythro-neopterin-3'-triphosphat als Primärprodukt bildet, ist das erste faßbare Produkt des Comamonas-Enzymkomplexes 7,8-Dihydro-D-erythro-neopterin-2',3'-cyclophosphat, von dem Cone et al. annehmen, daß bei seiner Hydrolyse die Konfiguration der Seitenkette von D-erythro in L-threo umgewandelt wird (32). Auf diese Weise läßt sich das Vorkommen der beiden optischen Isomeren in Mikroorganismen erklären. Brown konnte außerdem eine Neopterin-Epimeraseaktivität in E. coli nachweisen (34).

Tabelle 4. Vorkommen von Neopterin in Mikroorganismen

<u>E. coli</u> (35)	Neopterin-3'-Phosphat
<u>Methylosinus trichosporium</u> (36)	D-erythro-Neopterin
<u>Methylosinus sporium</u> (36)	D-erythro-Neopterin
<u>Pseudomonas fluoreszens</u> (37)	L-threo-Neopterin
<u>Azotobacter agilis</u> (38)	D-erythro-Neopterin-3'- β -D-Glucuronid
<u>Serratia indica</u> (39)	L-threo-, D-erythro-Neopterin
<u>Methylosinus capsulatus</u> (40)	L-threo-Neopterin-2',3'-cyclophosphat
<u>Photobacterium phosphoreum</u> (41)	D-erythro-Neopterin-2',3'-cyclophosphat

Der Nachweis, daß in *E. coli* L-threo-Neopterin vorhanden ist, scheint die Ansicht von Cone et al. (32), daß das L-threo-Isomere generell durch Hydrolyse des D-erythro-Neopterin-2',3'-cyclophosphat gebildet wird, zu widerlegen, da bei *E. coli* als Primärprodukt der Cyclohydrolase 7,8-Dihydro-D-erythro-neopterin-3'-triphosphat gebildet wird (31).

6.2. Vorkommen von Pteridinen in Mikroorganismen

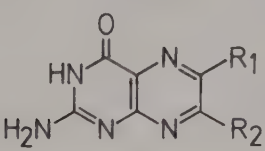
Unkonjugierte Pteridine wurden in einer Vielzahl von Mikroorganismen nachgewiesen. Erythpterin (I) wurde aus dem menschlichen Tuberkulosebazillus und aus Mycobacterium lacticola isoliert, wo es wahrscheinlich als Glucosid vorkommt (42;43). Goto et al. entdeckten in E. coli ein neues phosphoryliertes Pterin, welches sie als Neopterin-3'-phosphat (II) identifizierten (35). Hatfield et al. untersuchten Blaualgen auf ihren Pteridin-gehalt und fanden ein Glucosid des 6-Hydroxymethylptेरins (III) und mehrere Glycoside des Biopterins (IV) (mit Glucose, Galactose, Xylose, Ribose, 6-Desoxyribose und Xyluronsäure als Zuckeranteil) (44). Krumdieck isolierte aus Corynebakterien 6-Hydroxymethylpterin und untersuchte seine Biosynthese (45). Goto et al. fanden im Kulturmedium von Azotomonas isolata Pterin (V), Isoxanthopterin (VI), nach der Hydrolyse ein 6-Trihydroxypropylpterin (VII), und als eine neue in der Natur vorkommende Verbindung Xanthopterinulfat (VIII), welches

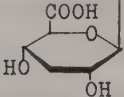
von ihnen auch in E. coli nachgewiesen wurde (46). Aus 5,6 kg Mycobacterium smegmatis isolierten Goto et al. 25 mg eines 6-Pentahydroxypentylpteringlucuronids (IX), sowie Pterin-6-carbonsäure (X)(47). Kobayashi et al. untersuchten die photosynthetisierenden Bakterien Rhodospirillum rubrum, Rhodomicrobium vanielli und Rhodopseudomonas palustris und fanden Neopterin, Pterin, Xanthopterinylsulfat, Xanthopterin (XI), 6-Hydroxymethylpterin und Pterin-6-carbonsäure (48). Suzuki et al. isolierten aus Azotobacter agilis Neopterin-3'- β -D-glucuronid (XII)(38). Mit Hilfe des Crithidiatests wurde eine D-erythro-Konfiguration der Seitenkette bestimmt. Viscontini et al. isolierten aus dem Kulturmedium von Pseudomonas fluoreszens L-threo-Neopterin (XIII)("Monapterin"); die absolute Konfiguration wurde mit Hilfe des Drehwertes bestimmt (37). Außerdem wurde 6-Hydroxymethylpterin, Pterin, sowie 6-Methyl-8-ribityl-2,4,7-trioxodihydropteridin (XIV) gefunden. Guroff et al. versuchten aus Pseudomonas sp. den natürlichen Phenylalaninhydroxylase-Cofaktor zu isolieren und fanden in dem Organismus L-threo-Neopterin als Hauptpterin, sowie Pterin-6-carbonsäure, Pterin und Hinweise auf die Gegenwart von erythro-Neopterin und einem cyclischen Phosphat des Neopterins (49). Suzuki et al. isolierten aus dem Kulturmedium von Pseudomonas ovalis vier Ribityllumazinverbindungen, näm-

lich 6-Methyl-, 6-(3-Indoyl)-(XV), 6-(p-Hydroxyphenyl)-8-(1-D-ribityl)-2,4,7-trioxohexahydropteridin (XVI), sowie als eine neue Verbindung 6-Carboxyaethyl-8-(1-D-ribityl)-2,4,7-trioxohexahydropteridin (XVII)(50). Kidder entdeckte in dem Protozoon Tetrahymena pyriformis ein neues Pterin, welches er mit Hilfe des Crithidiatests als L-threo-Biopterin (XVIII) identifizierte und das den Namen "Ciliapterin" erhielt (51). McNutt et al. isolierten aus einer Mutante von Achromobacter petrophilum erstmals ein 6-(3-Indoyl)-8-(1-D-Ribityl)-2,4,7-trioxohexahydropteridin (XV)(52). Iwai et al. isolierten aus dem Kulturmedium von Serratia indica die beiden Pterine L-threo-Neopterin und Isoxanthopterin, aus dem zellfreien Extrakt L-threo- und D-erythro-Neopterin (XIX), 6-Hydroxymethylpterin, sowie mehrere nicht identifizierte fluoreszierende Verbindungen (39). Cone et al. untersuchten das GTP-Cyclohydrolasesystem von Comamonas sp. und fanden hier, im Gegensatz zum Cyclohydrolasesystem von E. coli, welches ein Neopterin-3'-phosphat als Primärprodukt bildet, bei Comamonas D-erythro-Neopterin-2',3'-cyclophosphat (XX) als erstes Produkt der Cyclohydrolase (32). Pouteau-Thouvenot fand im Bacterium roseus fluorescens Pterin, Isoxanthopterin, Pterin-6-carbonsäure, 6-Hydroxymethylpterin, Monapterin, sowie 7-Hydroxy-6-methyl-8-ribityllumazin (XIV)(53). Urushiba et al. bewiesen erst-

mals das Vorhandensein von 6-Methylpterin (XXI) in einem Organismus durch Isolierung der Verbindung aus methanoxidierenden Bakterien (36). Neben dem 6-Methylpterin wurden auch Pterin-6-carbonsäure, D-erythro-Neopterin und Pterin isoliert. Urushiba et al. isolierten aus dem methanoloxidierenden Methylococcus capsulatus Pterin-6-carbonsäure, 6-Hydroxymethylpterin, sowie das cycl. L-threo-Neopterin-2',3'-Phosphat (40). Diese Verbindung scheint der Cofaktor seiner Methanoldehydrogenase zu sein. Aus Photobacterium phosphoreum isolierten Suzuki et al. D-erythro-Neopterin-2',3'-cyclophosphat (XXII)(41). Die Pteridine, deren Vorkommen in Mikroorganismen beschrieben ist, sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

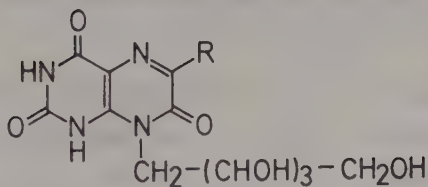
Tab. 5. Pteridine, deren Vorkommen in Mikroorganismen beschrieben wurde.

lfde. Nr.			Zitate
	R ₁	R ₂	
I	-OH	-CH ₂ COOH	42, 43
II	-(CHOH)CH ₂ OPO ₃ ²⁻	-H	35
III	-CH ₂ OH	-H	44, 45, 48, 37, 39, 53, 40

lfde. Nr.	R ₁	R ₂	Zitate
IV	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	-H	44
V	-H	-H	46, 48, 37, 49, 53, 36
VI	-H	-OH	46, 39, 53,
VII	-(CHOH) ₂ CH ₂ OH	-H	46, 48, 49
VIII	-OSO ₃ ⁻	-H	46, 48
IX	-(CHOH) ₄ CH ₂ OH	-H	47
X	-COOH	-H	47, 48, 49, 53, 36, 40
XI	-OH	-H	48
XII	$\begin{array}{c} \text{-(CHOH)}_2\text{CH}_2\text{O} \\ \text{COOH} \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$ 	-H	38
XIII	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{OH} \end{array}$	-H	37, 49, 39, 53
XVIII	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{OH} \end{array}$	-H	51
XX	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O}^- \\ \diagdown \quad / \\ \text{P} \\ / \quad \backslash \\ \text{HO} \quad \text{O} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	-H	32, 40
XXI	-CH ₃	-H	53

lfde. Nr.	R ₁	R ₂	Zitate
-----------	----------------	----------------	--------

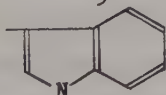
XIX	$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ -\text{C}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	-H	39, 36
-----	--	----	--------



lfde. Nr.	R	Zitate
-----------	---	--------

XIV	-CH ₃	37, 50, 53
-----	------------------	------------

XV



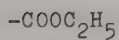
50, 52

XVI



50

XVII



50

II. Tetrahydropterine als Elektronenmediatoren in E. coli

1. Atmungskette und oxidative Phosphorylierung bei Bakterien

Während bei Eukaryonten die Komponenten der Atmungskette in den Mitochondrien liegen, ist bei Bakterien die cytoplasmatische Membran Träger dieses Elektronentransportsystems. Die Atmungskette aerob kultivierter E. coli-Zellen unterscheidet sich von der mitochondrialen Atmungskette durch das Fehlen der Cytochrome vom C-Typ; außerdem ist bei ihr eine Malat-Dehydrogenase und eine D-Lactat-Dehydrogenase direkt angeschlossen. Über die Orte der Energiekopplung besteht noch keine einheitliche Auffassung. Auch für die Energiebilanz wurden unterschiedliche Werte angegeben: In intakten Bakterienzellen wurden P/O-Quotienten bis zu 2,8 gemessen (54). Der Teil der Atmungskette, in dem der Elektronentransport durch Cytochrome vermittelt wird, beginnt im Vergleich zu den Mitochondrien bei einem positiverem Redoxpotential (55). Ein Schema der Atmungskette von E. coli zeigt die folgende Abbildung.

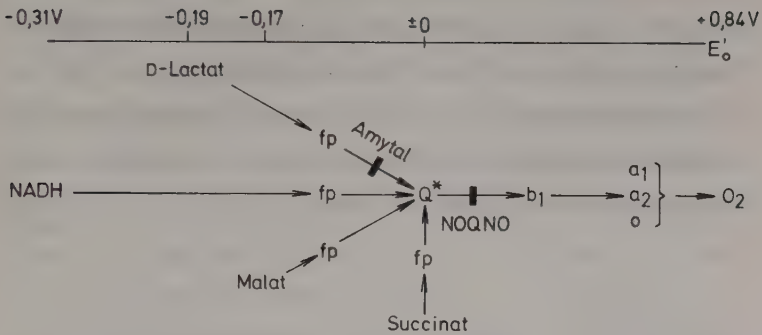


Abb. 4. Elektronentransportkette von *E. coli*. Q* = Ubichinon, f_p = Flavoprotein, NOQNO = 2-n-Nonyl-4-hydroxy-chinolin-N-oxid.

Atmungsmessungen lassen sich am einfachsten mit einer Sauerstoffelektrode durch führen, die man mit einem Schreiber verbindet. In das Analysengefäß wird zunächst der auf die Meßtemperatur eingestellte Puffer eingefüllt, die elektrische Gleichgewichtseinstellung abgewartet und anschließend Atmungsprotein zugesetzt. Die durch alleinigen Zusatz von Membranprotein erhaltene Grundatmung ist ein Maß für das in der Präparation enthaltene endogene Substrat und muß von den folgenden Werten abgezogen werden. Nach Zusatz von Atmungssubstrat und ADP werden ebenfalls die Steigungen der Schreiberkurve bestimmt. Das Verhältnis der Steigungen vor und nach Zusatz von ADP ist dann ein Maß

für die Kopplung der Phosphorylierung an die Atmung. Aus den jeweiligen Steigungen der Atmungskurve lassen sich mit Hilfe des Wertes für die Sauerstoffkonzentration im Puffer des Meßgefäßes die Atmungsraten (nA Sauerstoffverbrauch pro Minute und Milligramm Atmungsprotein) berechnen. Das Prinzip einer Atmungsmessung mit der Sauerstoffelektrode zeigt Abb. 5.

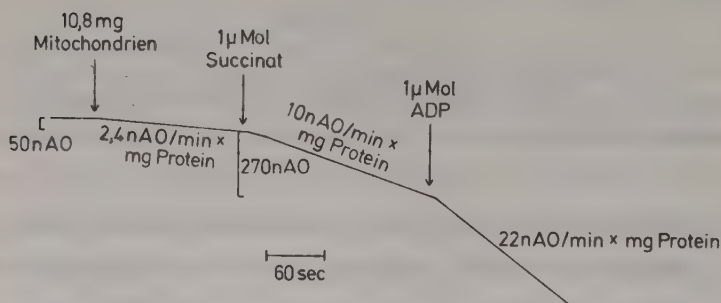


Abb. 5. Atmungsmessungen mit der Clark-Sauerstoff-elektrode an einer Rattenlebermitochondrienpräparation. Puffer: 300 mM Saccharose, 15 mM Kaliumphosphat, 20 mM Trishydroxymethylaminomethan, 0,2 mM EDTA, 15 mM MgCl_2 ; pH = 7,4. Meßzellenvolumen: 2,66 ml.

2. Isolierung der cytoplasmatischen Membran

Die cytoplasmatische Membran läßt sich auf zwei verschiedene Arten präparieren: durch Gewinnung einer partikulären oder einer vesikulären Fraktion.

Nach der ersten Methode wird die Membran durch Ultraschall in kleine Stücke zerrissen, die sich durch Differentialzentrifugation in zwei verschiedene Fraktionen auftrennen lassen. Sie besitzen unterschiedliche biologische Eigenschaften und werden gewöhnlich als "kleine" und "große Partikel" bezeichnet. Während die großen Partikel Benzochinone, Cytochrome und die Hauptmenge der Succinatoxidaseaktivität enthalten, zur oxidativen Phosphorylierung aber nicht befähigt sind, katalysiert die langsamer sedimentierende Fraktion (kleine Partikel) die oxidative Phosphorylierung mit einer Anzahl verschiedener Substrate. Sie enthält sowohl Naphthochinone als auch Benzochinone. Aus dem Überstand der Differentialzentrifugation läßt sich durch Ammonsulfatfällung eine Fraktion isolieren, die selbst die Komponenten der Atmungskette, wie Cytochrome und Chinone, nicht in nennenswerten Umfang enthält. Wenn sie den kleinen Partikeln zugesetzt wird, erhöht sie aber deren Phosphorylierungsrate auf ein Vielfaches des ursprünglichen Wertes (56). Da sie die Phosphorylierung stärker an die Atmung ankoppelt, wird diese Fraktion als Kopplungsfaktor bezeichnet.

Nach der zweiten Methode werden die Bakterien mit Lysozym behandelt und unter Zusatz von EDTA ihre Mureinschicht aufgelöst. Die so erhaltenen "Protoplasten" werden dann durch Behandeln mit einer hypotonischen

Lösung osmotisch geschockt. Hierbei bleibt die Membran intakt, da sich die Stelle, durch die das Cytoplasma austritt, wieder völlig schließt. Die so erhaltenen "Membranvesikel" oder "Ghosts" können deshalb für Untersuchungen am aktiven Transport verwendet werden (57).

Die kleinen Partikel behalten ihre ursprüngliche Form als Bruchstücke der cytoplasmatischen Membran nicht bei, sondern rollen sich ein. Neuere Untersuchungen an M. phlei über die Orientierung der Zellmembran bei Elektronentransportpartikeln und Ghosts (58) sprechen dafür, daß bei den Membranvesikeln die ursprüngliche Orientierung erhalten bleibt, während bei den kleinen Partikeln die Innenseite der Membran nach außen gewandt ist.

3. Untersuchung der Cytochromreduktion durch 2-Amino-4-hydroxy-6,7-dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropteridin mit Hilfe der Differenzspektroskopie

Die in den kleinen Partikeln enthaltenen Cytochrome besitzen im sichtbaren Bereich ein charakteristisches Absorptionsspektrum, das in der oxidierten und reduzierten Form deutlich verschieden ist. Die Spektren können allerdings nicht direkt aufgenommen werden, da die Partikelsuspension auch noch andere Bestandteile, wie Proteine und Phospholipide enthält. Man mißt des-

halb das Differenzspektrum, indem man die Komponenten der Atmungskette chemisch oxidiert und in der Meßküvette ein Atmungssubstrat zusetzt. Im Differenzspektrum wird so das Spektrum der reduzierten Cytochrome von dem der oxidierten subtrahiert. Die Absorptionsbanden lassen sich den einzelnen Komponenten der Atmungskette eindeutig zuordnen (Tab. 5).

Tab. 5. Absorptionsbanden im Differenzspektrum der Komponenten der Atmungskette von *E. coli* (59).

Bande	Cytochrom	$\lambda_{\max}$ (nm)	ϵ ($\lambda_1 - \lambda_2$)
β	b_1	533	-
α	b_1	560	17500 (560-575)
α	a_1	595	-
α	a_2	630	8500 (630-615)
Soret (hptsächl. δ - Bande v. Cyt. b_1)		432	-
Flavoproteintrog (Minimum)		465	11500 (465-510)

Bei den in dieser Arbeit verwendeten kleinen Partikeln aus *E. coli* K 12 lagen die Maxima der Cytochrombanden im Tieftemperatur-Differenzspektrum bei 530 und 559 nm für b_1 , für a_1 bei 593, für a_2 bei 641 nm und für die Soret-Bande bei 427 nm. Unterschiede im Differenzspektrum ergeben sich bei Verwendung verschiedener Stämme

von E. coli (60).

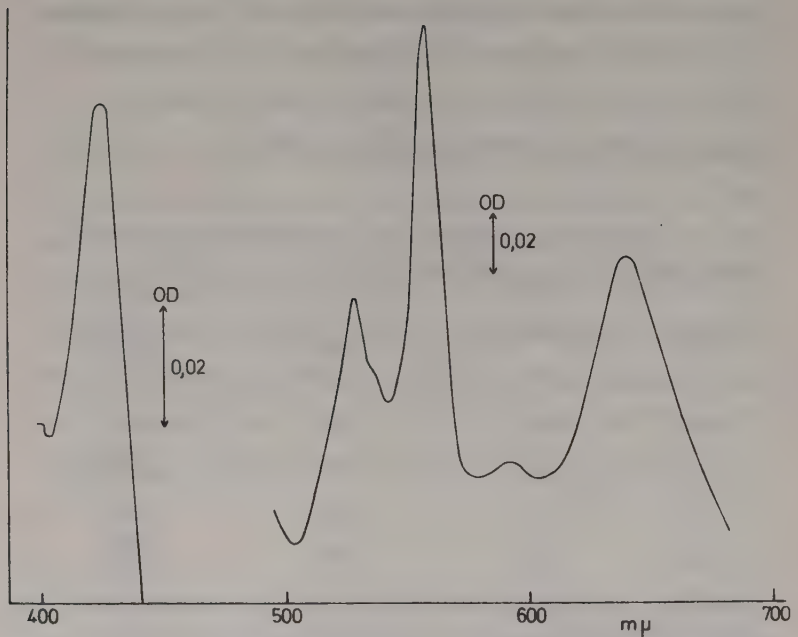


Abb. 6. Tieftemperatur-Differenzspektrum der kleinen Partikel aus E. coli K 12 mit D- Lactat als Atmungs-substrat. Puffer: 100 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris, 30 % Glycerin; pH 7,4. Proteinkonzentration 70 mg/ml, D-Lactat $5 \mu\text{Mol/ml}$. Schichtdicke 0,2 cm. $t = -196^\circ\text{C}$.

Die durch die Differenzspektroskopie mit Dithionit als Reduktionsmittel ermittelten Konzentrationen der Cytochrome lagen bei $0,28 \mu\text{Mol}$ Cytochrom b_1 bzw. $0,13 \mu\text{Mol}$ Cytochrom a_2 pro Gramm Membranprotein. Die Neo-

pterinkonzentration ($0,015 \mu\text{Mol/g}$ Bakterienfeuchtmasse) beträgt damit ein Zehntel bzw. ein Zwanzigstel der Cytochromkonzentration. Berücksichtigt man die Verluste bei der Isolierung, so liegt Neopterin in *E. coli* in einer den Cytochromen ähnlichen Konzentration vor.

6,7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) reduziert in neutraler Lösung die Komponenten der Atmungskette (Abb 7).

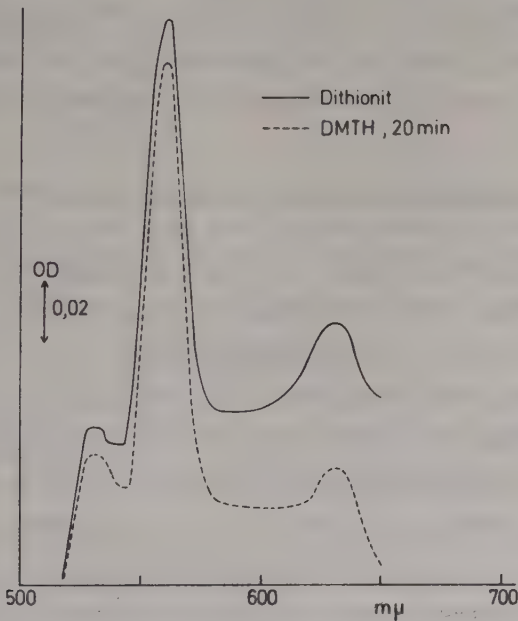


Abb. 7. Differenzspektrum der kleinen Partikel aus *E. coli* mit 6,7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) als Atmungssubstrat. Puffer: 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris; pH 7,4. Proteinkonz. 13,3 mg/ml, DMTH-Konz. 1,65 mM. Schichtdicke 1 cm, $t = 25^\circ\text{C}$.

Unter anaeroben Bedingungen wird Cytochrom b_1 mit DMTH als Atmungssubstrat bis zu 80 % des mit einem Überschuß von Dithionit als Reduktionsmittel erhaltenen Wertes reduziert. Das Differenzspektrum zeigt keine Unterschiede gegenüber dem durch die üblichen Atmungssubstrate erhaltenen, wie mit D-Lactat, Malat oder Succinat. Im Gegensatz zu den Mitochondrien, bei denen nur Cytochrom c, c_1 und a/a_3 , nicht aber Cytochrom b durch DMTH reduziert wird, sind im Differenzspektrum von E. coli neben den Oxidasebanden (590 und 630 nm) auch die Cytochrom b_1 -Banden (560, 533 nm) sichtbar.

4. Atmungsmessungen mit der Sauerstoffelektrode

Die Messungen wurden mit einer Sauerstoffelektrode nach Clark (61,62) durchgeführt. Die thermostatisierte Meßzelle hatte ein Volumen von 2,66 ml und wurde mit einem Magneten gerührt. Die Beschallzeit bei der Darstellung der kleinen Partikel wurde so gewählt, daß mit Malat als Atmungssubstrat maximale Atmungsraten erzielt wurden. Die so erhaltenen kleinen Partikel zeigten auch mit dem Kopplungsfaktor keine Stimulierung der Atmung nach Zusatz von ADP. Auf diese Tatsache wird noch später eingegangen. Die Präparation hatte eine verhältnismäßig hohe NADH-Oxidaseaktivität, konnte aber kein Pyruvat und α -Ketoglutarat veratmen. Zusatz von NAD^+ stimulierte die Grundatmung (Tabelle 6).

Tabelle 6. Atmungsraten verschiedener Substrate mit den kleinen Partikeln von E. coli. Puffer: 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM Trishydroxymethylaminomethan, 2 mM K-Phosphat; pH 7,4. Meßzellenvolumen: 2,66 ml.

Substrat	Atmungsrate
c = 0,4 mM	nA O/Min. x mg Protein
NADH	470
DMTH	80
D-Lactat	56
Malat	28
Succinat	10
Pyruvat	0
α -Ketoglutarat	0
NAD ⁺ (c = 4 mM)	15

Tetrahydropterine sind sehr oxidationsempfindlich und werden auch chemisch durch den in der Lösung enthaltenen Sauerstoff oxidiert. Rembold und Buff bestimmten die Stabilität von Tetrahydroneopterin und 6,7-Dimethyltetrahydropterin in 0,3 M Saccarosepuffer und fanden Halbwertszeiten von 8 und 14 Minuten. Abbildung 8 zeigt, wie sich dieser Umstand bei der Messung mit der Sauerstoffelektrode auswirkt: Die Steigung des ersten Teils der Kurve ist ein Maß für die chemische Oxidation. Nach Zusatz von kleinen Partikeln ist die Atmungsrate sechsmal größer.

In der vorliegenden Arbeit wird unter "Veratmung" des DMTH die Differenz zwischen Gesamtsauerstoffverbrauch

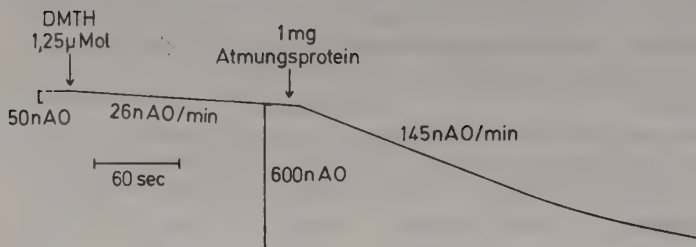


Abb. 8. Atmungsmessung an kleinen Partikeln von *E. coli* mit 6,7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) als Substrat. Puffer: 100 mM Trishydroxymethylaminomethan, 2 mM K-Phosphat; pH 7,4. Meßzellenvolumen: 2,66 ml.

in Anwesenheit von Atmungsprotein (chemische + enzymatische Oxidation des DMTH) und dem Sauerstoff in Abwesenheit von Atmungsprotein (chemische Oxidation des DMTH) verstanden.

4.1. Hemmung durch Inhibitoren der Atmungskette

Im Vergleich zur Mitochondrienatmung läßt sich die bakterielle Atmung nur schwer hemmen. Eine Reihe von Inhibitoren der mitochondrialen Atmung ist sogar wirkungslos. 2-n-Nonyl-4-hydroxychinolin-N-oxid, der beste Inhibitor der bakteriellen Atmung, blockiert die Chinone und ist bei sämtlichen Substraten wirksam (Abb. 4). Die Veratmung von Tetrahydropterin wird durch

diesen Hemmstoff aber nicht beeinflusst. Amytal, das die NADH-Veratmung hemmt, nicht aber die von D-Lactat, hemmt die DMTH-Veratmung ebenfalls nicht (Tab. 7).

Tab. 7. Vergleich der Atmungshemmung bei NADH und D-Lactat bzw. bei 6,7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) durch Atmungsketteninhibitoren. Kleine Partikel von E. coli, Proteinmenge 4 mg. Puffer: 100 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM Trishydroxymethylaminomethan, 2 mM K-Phosphat; pH 7,4. Meßzellenvolumen 2,66 ml. NOQNO = 2-n-Nonyl-4-hydroxychinolin-N-oxid.

Hemmstoff (mM)	Substrat (μ Mol)	% Hemmung	DMTH (μ Mol)	% Hemmung
NOQNO (0,2)	NADH (10)	67	1,25	0
	D-Lactat (10)	43		
	D-Lactat (6)	33		
	NAD ⁺ (10)	0		
Amytal (3,0)	NADH (1)	0	1,25	0
	D-Lactat (5)	41	0,5	0
Cyanid (40)	D-Lactat (10)	70	10	46

5. Oxidative Phosphorylierung und Tetrahydropterin als Atmungssubstrat

ADP stimulierte die Atmung der kleinen Partikel nicht. Dennoch ließ sich in Inkubationsansätzen ATP im gekoppelten Enzymtest mit Hexokinase und Glucose-6-

Phosphat-Dehydrogenase durch die Reduktion von NADP^+ nachweisen und quantitativ bestimmen. ATP wird aber auch in Abwesenheit eines Atmungssubstrats gebildet, wobei die ATP-Bildung von der verbrauchten Sauerstoffmenge unabhängig ist. Das zugesetzte ADP wird also wahrscheinlich durch Myokinase (Adenylatkinase, E.C. 2.7.4.3.) oder durch die Nucleosidmonophosphat-Kinase (E.C. 2.7.4.4.) in AMP und ATP disproportioniert. Ein Zusatz von AMP zum Inkubationsansatz erniedrigte in

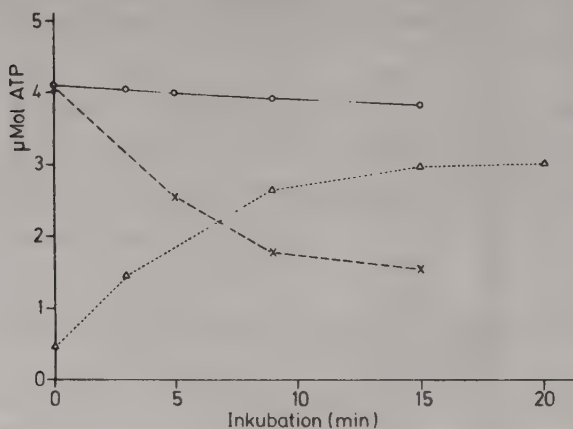


Abb. 9. Myokinaseaktivität in Präparationen des Kopplungsfaktors von *E. coli*. Inkubationsansätze: $\triangle \cdots \triangle$ Myokinaseaktivität: 5 ml Puffer (100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris, 2 mM K-Phosphat; pH 7,4), 20 μMol ADP, 0,6 mg Kopplungsfaktor. $\times \cdots \times$ Reversibilität der Myokinaseaktivität: 5 ml Puffer, 5 μMol ATP, 16 μMol AMP, 0,6 mg Kopplungsfaktor. $\circ \cdots \circ$ ATPase-Aktivität: 5 ml Puffer, 5 μMol ATP, 0,6 mg Kopplungsfaktor.

der Tat die gebildete ATP-Menge. Die Disproportionierung war reversibel: wenn ATP und AMP zusammen inkubiert wurden, erniedrigte sich die gefundene ATP-menge in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und der zugesetzten AMP-Menge. Die Präparation enthielt jedoch nur eine geringe ATPase-Aktivität (Abb. 9).

Myokinase läßt sich durch Kupfersulfat hemmen. Tabelle 8 zeigt die Hemmung der Myokinaseaktivität im Kopplungsfaktor durch Kupfersulfat.

Tab. 8. Hemmung der Myokinaseaktivität im Kopplungsfaktor aus *E. coli* durch Kupfersulfat. Inkubationsansatz: 5 ml Puffer (100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM Tris; Tris; pH 7,4), 0,25 mg Kopplungsfaktorprotein, 20 μ Mol μ Mol ADP. Inkubationszeit 15 Min.

CuSO ₄ (mM) ⁴	gebildete Menge ATP (μ Mol/15 Min.)
0,4	2,08
1,0	1,50
1,2	1,32
2,4	0,55
5,0	0,32
6,0	0,20

Die mit dem Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Test ermittelten Myokinaseaktivitäten betrugen für die kleinen Partikel 0,2 μ Mol disproportioniertes ADP/Min. x mg Protein und für den Kopplungsfaktor 1,5 μ Mol.

Um neben der Myokinaseaktivität eine eventuelle oxidative Phosphorylierung nachweisen zu können, wurde dem Inkubationsansatz $^{32}\text{P}_i$ zugesetzt. Nach Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von Perchlorsäure und Neutralisieren der Inkubationslösung wurde ATP als Träger zugesetzt und der Ansatz dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Es wurden keine nennenswerten Mengen anorganisches Phosphat in die Nucleotide eingebaut.

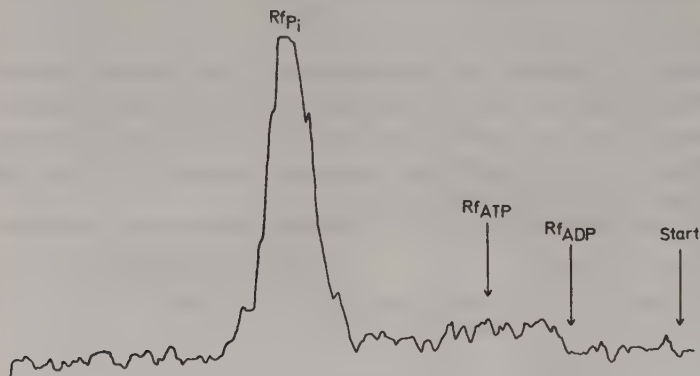


Abb. 10. Aktivitätsverteilung auf einem Dünnschichtchromatogramm zur Untersuchung des Einbaus von $^{32}\text{P}_i$ in die Nucleotide durch die kleinen Partikel + Kopplungsfaktor. Inkubationsansatz: 5 ml Puffer (100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris, 0,1 mM Phosphat; pH 7,4), 4 mg kleine Partikel, 3 mg Kopplungsfaktor, 5 μMol ADP, $^{32}\text{P}_i$ (50 nMol, 750 Ci/Mol). Inkubationszeit 15 Min. Nach Zusatz von 1 ml HClO_4 (60%) und Neutralisieren wurden 5 μMol ATP als Träger zugesetzt.

6. Aktiver Transport von Aminosäuren mit 6,7-Dimethyl-tetrahydropterin als Energielieferanten

Für diese Untersuchungen wurden Membranvesikel nach Kaback (63) präpariert. Die Vesikel wurden in 0,1 M K-Phosphatpuffer, pH 7,4 suspendiert und der Suspension ^3H -Prolin und Atmungssubstrat zugesetzt. Der Einbau

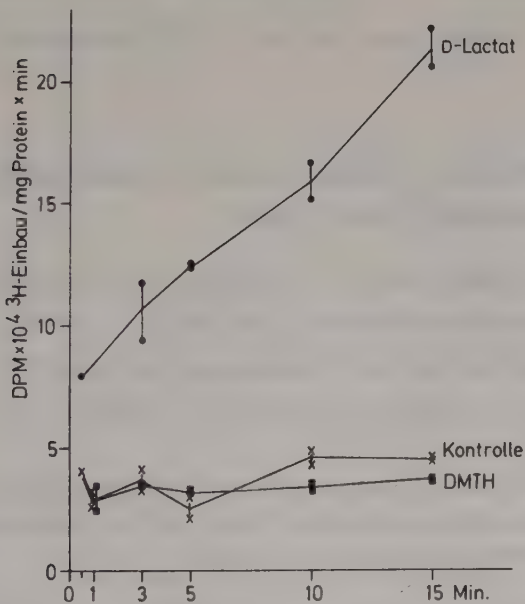


Abb. 11. Einbau von ^3H -Prolin in die Membranvesikel von *E. coli* mit DMTH bzw. D-Lactat als Atmungssubstrate. Kontrolle ohne Substrate. Inkubationsansatz: 100 μl 0,1 M K-Phosphat, 0,2 mg Vesikelprotein, 0,4 mM DMTH bzw. D-Lactat, 1,25 μCi ^3H -Prolin (500 mCi/mMol).

wurde durch starkes Verdünnen des Ansatzes mit Puffer und sofortiges Filtrieren durch Milliporefilter gestoppt. Nach Waschen mit Puffer wurden die beladenen Filter in einem Probenverbrennungsapparat zu Kohlendioxid und Wasser verbrannt und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Während mit D-Lactat Tritium in die Vesikel eingebaut wurde, konnte mit 6,7-Dimethyltetrahydropterin als Atmungssubstrat keine von der Kontrolle abweichende Radioaktivität festgestellt werden.

7. 6,7-Dimethyltetrahydropterin als Atmungssubstrat bei Membranvesikeln von E. coli

Atmungsmessungen mit der Sauerstoffelektrode ergaben, daß bei den Membranvesikeln der Sauerstoffverbrauch sich lediglich in der Größenordnung der Werte für die chemische Zersetzung bewegte. Tabelle 9 zeigt,

Tab. 9. Dimethyltetrahydropterin als Atmungssubstrat für E. coli-Membranvesikel. Puffer: 0,1 M K-Phosphat, pH 7,4. Meßzellenvolumen 2,66 ml.

Vesikelmenge (mg)	DMTH (mM)	nA O/Min.	nA O/Min. x DMTH
10	2	250	125
2	1	130	130
2	0,4	30	75
0,35	0,4	30	75
0,35	0,04	3	75

daß Dimethyltetrahydropterin von den Vesikeln nicht
veratmet werden kann. Offensichtlich ist die Membran
für das Pterin nur unwesentlich durchlässig.

Diskussion

Im Gegensatz zum Biopterin beim Säuger ist bei *E. coli* L-threo-Neopterin das Hauptpterin. Wie auch im Falle der Mitochondrien (20, 24) kommt das Polyhydroxyalkylpterin in einer mit den Cytochromen vergleichbaren Konzentration vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Pterine in der Tetrahydro-Form als Substrate des bakteriellen Elektronentransportsystems dienen können, wie das für die Säugermitchondrien bereits nachgewiesen worden ist. Die Differenzspektren der *E. coli*-Cytochrome stimmen bei Verwendung von 6.7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) als Atmungssubstrat mit denen, die durch die Substrate D-Lactat, Malat oder Succinat erhalten werden, völlig überein. Sämtliche durch einfache Differenzspektroskopie sichtbar zu machenden Cytochrome, nämlich b_1 , a_1 und a_2 , können durch DMTH vollständig reduziert werden. In dieser Hinsicht besteht ein Unterschied zu den Rattenlebermitochondrien, bei denen die Atmungskette erst auf der Stufe des Cytochrom c reduziert wird.

Obwohl Cytochrom b_1 aus *E. coli* bereits rein präpariert

und sein Standard-Redoxpotential zu $E'_0 = -0,34$ V bestimmt worden ist, finden sich in der Literatur keine Angaben für sein Redoxpotential in vivo. Es wurde lediglich berichtet, daß im Verlauf seiner Isolierung ein Protein abgetrennt wurde, welches, der reinen Präparation zugesetzt, deren Standard-Redoxpotential auf Werte größer als $E'_0 = 0,0$ V erhöhen soll (64). Da DMTH Cytochrom b_1 reduziert, bedeutet dies, daß sein Redoxpotential in den Atmungspartikeln einen Mindestwert von $E'_0 = +0,15$ V besitzen muß.

Auch besteht noch keine einheitliche Vorstellung über die Funktion und den Ort der Chinone im Elektransportsystem von *E. coli*. Cox und Mitarbeiter vermuten, daß sie sowohl vor als auch nach dem Cytochrom b_1 vorhanden sind. Da bei den Chinonen bis jetzt noch nicht nachgewiesen werden konnte, daß ihr Redoxpotential von Proteinen verändert werden kann, nehmen die Autoren an, daß sie nicht als Elektronenüberträger wirken (65). Andererseits schließen Klingenberg und Kröger aus spektroskopischen Daten, daß das Ubichinon sich im Hauptweg des Elektronentransportsystems befindet (66). Auf Grund seiner prozentualen Reduktion im Fließgleichgewicht muss ein Platz zwischen den Flavinen angenommen werden (67). Ubichinon besitzt ein Redoxpotential von $E'_0 = +0,065$ V, es kann daher durch DMTH nicht reduziert werden. Der Befund dieser Arbeit, daß die Hem-

mung der Chinone die Oxidation des DMTH nicht beeinflusst, steht im Widerspruch zur Auffassung von Cox et al., falls die Elektronen von DMTH ausschließlich auf das Cytochrom b_1 übertragen werden. Dies ist aber nicht erwiesen. Die Nichthemmbarkeit der Atmung durch NOQNO (2-n-Nonyl-4-hydroxychinolin-N-oxid) mit DMTH als Atmungssubstrat zeigt, daß Ubichinon bei der Veratmung hydrierter Pterine keine Funktion hat. Im Gegensatz dazu läßt sich die DMTH-Veratmung durch Cyanid hemmen. Dies beweist, daß sie durch die Cytochromoxidase vermittelt wird.

In den Präparationen der kleinen Partikel und des Kopplungsfaktors wurde in dieser Arbeit Myokinase nachgewiesen. Ihre Aktivität war beim Kopplungsfaktor etwa achtmal so groß wie bei den kleinen Partikeln ($1,5/\mu\text{Mol ADP/Min.} \times \text{mg Protein}$ bzw. $0,2/\mu\text{Mol ADP/Min.} \times \text{mg Protein}$). Das Vorkommen der Myokinase bei *E. coli* ist bekannt (68). Beim Arbeiten ohne $^{32}\text{P}_i$ sind Irrtümer bei der Interpretation der oxidativen Phosphorylierung möglich, zumal ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, p-Chloromercuribenzoat, auch die Adenylatkinase hemmt. Inkubation mit $^{32}\text{P}_i$ unter Verwendung von D-Lactat als Atmungssubstrat zeigt die schlechte Kopplung der Partikelpräparationen. Die Frage, ob DMTH als Atmungssubstrat eine Phosphorylierung ermöglicht, kann deshalb nicht eindeutig beantwortet werden.

Prolin wird nicht aktiv durch die Vesikelmembran transportiert, wenn an Stelle von D-Lactat DMTH als Atmungssubstrat verwendet wird. Dieses Ergebnis läßt zunächst zwei Interpretationen zu:

a. DMTH kann nicht durch die Membran diffundieren und ist deshalb als Atmungssubstrat unwirksam.

b. DMTH gelangt zwar an die geeignete Stelle im Elektronentransportsystem, ist aber für die Energiegewinnung ungeeignet.

Die Atmungsmessungen zeigten, daß DMTH von den Vesikeln nicht veratmet werden kann. Die erste Möglichkeit, daß nämlich DMTH die Atmungskette in diesem Fall überhaupt nicht erreicht, trifft also zu. Die Frage, ob hydrierte Pterine als Energiequelle für den aktiven Aminosäure-Transport dienen, läßt sich deshalb mit den Bakterienvesikeln nicht beantworten.

Zusammenfassung

1. Im Rahmen der Fragestellung nach der Funktion der Pteridine im Elektronentransport von Bakterien wurden Pteridine aus *E. coli* isoliert und ihre Konzentration bestimmt.

1. Der Trichloressigsäureextrakt von 3 kg *E. coli* B/X wurde auf Pteridine fraktioniert. Dabei wurde das Säulenchromatographische Verfahren nach Rembold und Buschmann verwendet.

2. Als Hauptpterin wurde threo-Neopterin rein isoliert. Seine Identifizierung erfolgte papierchromatographisch und durch das UV-Spektrum. Die Konzentration betrug 1200 $\mu\text{g/kg}$ Bakterienmasse.

3. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde der spezifische Drehwert gemessen. Der erhaltene Wert von $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +109 \pm 2^\circ$ stimmt verhältnismäßig gut mit Literaturwerten für das synthetische L-Isomere von $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +97$ bzw. $+113^\circ$ überein. Damit ist die L-threo-Struktur des Neopterins bewiesen.

4. Als weitere Pteridine wurden Pterin und Pterin-6-carbonsäure in einer Konzentration von je 50 $\mu\text{g/kg}$ nachgewiesen.

5. Eine gezielte Suche nach Biopterin, erythro-Neo-

pterin, Xanthopterin, Dihydroxanthopterin, Isoxanthopterin, Lumazin und den Hydroxylumazinen war ergebnislos. Ebenso konnten keine Phosphorsäureester von Pteridinen nachgewiesen werden.

II. Die Frage, ob hydrierte Pterine eine biologische Funktion im bakteriellen Elektronentransport besitzen, wurde durch Versuche an *E. coli* mit 6,7-Dimethyltetrahydropterin (DMTH) als Modells substanz zu beantworten versucht.

1. Die Differenzspektroskopie zeigt, daß DMTH in neutraler Lösung die Elektronen auf die Cytochrome einschließ lich des Cytochrom b_1 überträgt.

2. Die Atmungsmessungen zeigen, daß der Sauerstoff als Elektronenacceptor dient. Cyanid erniedrigt den Sauerstoffverbrauch bis auf die Selbstzersetzungsrate des DMTH. Dies zeigt, daß die DMTH-Veratmung durch Cytochromoxidase vermittelt wird. Außer den Hemmstoffen der Cytochromoxidase haben aber keine anderen Hemmstoffe der bakteriellen Atmung eine Wirkung auf die DMTH-Veratmung.

3. Die für diese Arbeit präparierten Atmungspartikel hatten eine schlechte Kopplung der oxidativen Phosphorylierung. Sie enthielten Myokinase mit einer Aktivität von $0,2 \mu\text{Mol ADP} / \text{Min.} \times \text{mg Protein}$; der entsprechende Wert für den Kopplungsfaktor der oxi-

dativen Phosphorylierung betrug 1,5 μ Mol ADP / Min.
x mg Protein.

4. Nach der Methode von Kaback präparierte Membranvesikel aus E. coli zeigten einen aktiven Transport von ^3H -Prolin, wenn D-Lactat als Atmungssubstrat verwendet wurde; mit DMTH wurde dagegen kein aktiver Transport beobachtet. Atmungsmessungen zeigten, daß exogenes DMTH nicht veratmet wird, weil es offenbar nicht durch die Membran diffundieren kann.

Experimenteller Teil

1. Säulenchromatographie

1.1. Dowex 1X8 (200 - 400 mesh)

Harzfüllung: 2 x 45 cm (140 ml)

Das in der Chloridform erhältliche Harz wird zunächst durch mehrmaliges Aufschlämmen in Wasser, Sedimentieren und Dekantieren von den extrem feinen Partikeln befreit und dann, mit 7 N Ameisensäure/1 M Natriumformiat verrührt, in die Säule eingeschlämmt. Danach wird mit dem gleichen Puffer solange eluiert, bis das Eluat frei von Chlorid ist. Anschließend wird die Harzfüllung nochmals aus der Säule genommen, mit 88 %iger Ameisensäure eingeschlämmt und mit 300 ml 88 %iger Ameisensäure gewaschen. Schließlich wird die Säule mit destilliertem Wasser neutralgewaschen.

Regenerieren: Nach jedem Lauf wird zunächst mit 500 ml 7 N Ameisensäure/1 M Natriumformiat eluiert, die Harzfüllung aus der Säule genommen, mit 88 %iger Ameisensäure abermals eingeschlämmt, mit 300 ml 88 %iger Ameisensäure eluiert und mit Wasser nachgewaschen, bis das Eluat fast neutral reagiert.

1.2. Phosphocellulose

Austauscherfüllung: 1,4 x 20 cm (30 ml).

Die Phosphocellulose (Serva) wird durch Aufschlännen in Wasser, Sedimentieren und Dekantieren von den zu feinen Partikeln befreit und portionsweise in die Glassäule eingeschlämmt. Sowohl Reinigen als auch Eluieren erfolgt mit 5 %iger Ameisensäure/5 % Ammonformiat, 5 % Ameisensäure und dest. Wasser.

1.3. ECTEOLA-Cellulose

Austauscherfüllung: 1,4 x 20 cm (30 ml).

Die ECTEOLA-Cellulose wird mehrmals mit Wasser aufgeschlämmt, sedimentiert und abdekantiert. Nach dem Einschlännen in die Säule wird nacheinander mit 500 ml 1 % NaOH und 500 ml 1 %iger Ameisensäure eluiert und dann mit Wasser nachgewaschen, bis das Eluat fast neutral reagiert.

2. Spektroskopie

2.1. Differenzspektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Shimadzu Multi-Purpose-Recording-Spektrometer MPS-50L aufgenommen.

Für die Differenzspektroskopie bei Zimmertemperatur wurden 1 cm-Küvetten mit 3 ml einer Suspension "kleiner

Partikel" gefüllt, die insgesamt 20 mg Protein enthielt. Für die Oxidation der Referenzküvette wurden 100 μ l einer 0,01 %igen $K_3Fe(CN)_6$ -Lösung verwendet, für die Reduktion in der Meßküvette 10 μ Mol Atmungs-substrat bzw. 5 μ Mol DMTH (ebenfalls in 100 μ l). Durch Zusatz von etwas Dithionit wurde das Ausmaß der Reduktion festgestellt.

Für die Tieftemperaturspektroskopie wurden 0,2 cm-Küvetten verwendet, die Konzentration der kleinen Partikel wurde entsprechend verfünffacht, wobei der Puffer 30 % Glycerin enthielt. Nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde wieder teilweise aufgetaut und nochmals eingefroren. Durch diese Prozedur ist der Küvetteninhalt mit Rissen und Sprüngen durchzogen, was eine bessere Auflösung des Spektrums ergibt.

2.2. Bestimmung des optischen Drehwertes

Für die Bestimmung des Drehwertes wurde die Substanz zweimal aus 0,3 ml Wasser umkristallisiert, in 1,0 ml 0,1 N HCl gelöst und der Drehwert mit einem Cary 60 Spektrometer in einer 1 cm-Küvette zu $[\alpha]_D^{25} = 10,7 \cdot 10^{-3}^\circ$ bestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 0,1 ml der Lösung mit 0,1 N HCl auf 2 ml verdünnt und die Extinktion bei 321,5 und 247 nm gemessen. Die daraus berechneten Konzentrationen lagen bei 9,55 bzw. bei 9,30 g/100 ml.

2.3. Fluoreszenzmessung

Für die Fluoreszenzmessung wurde ein Eppendorf-Photometer mit Fluoreszenzzusatz benützt. Zur Anregung wurde eine Wellenlänge von 366 nm verwendet und die Fluoreszenz auf den Standard Nr. 4876 (Blaufluoreszenz) bezogen.

3. Atmungsmessungen

Für die Atmungsmessungen wurde eine Apparatur der Fa. Eschweiler & Co. ("Combi-Analysator U") verwendet. Die Eichung des Gerätes erfolgte mit zwei Eichgasen (2 % und 20 % O_2) nach der Vorschrift des Herstellers. Das thermostatisierte Analysengefäß ($25^{\circ}C$, 2,66 ml) wurde mit Puffer beschickt, dessen Sauerstoffkonzentration durch Veratmen einer abgemessenen Menge Atmungssubstrat bestimmt, bzw. aus einschlägigen Tabellen errechnet wurde. Nach der elektrischen Gleichgewichtseinstellung wurden 4 mg kleine Partikel + 3 mg Kopplungsfaktor bzw. Membranvesikel und Atmungssubstrat hinzugefügt.

4. Messung der oxidativen Phosphorylierung

4.1. Enzymatische ATP-Bestimmung

Der Inkubationsansatz enthielt 5 ml Puffer (100 mM KCl,

20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris, 4 mM Phosphat; pH 7,4), 0,5 ml kleine Partikelsuspension (4 mg Protein), 1 Portion Kopplungsfaktor (3 mg Protein), ADP, 10 μMol Atmungs-substrat. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,5 ml 60 %ige HClO_4 gestoppt, das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und die Lösung mit gesättigter Kaliumkarbonatlösung gegen Methylorange neutralisiert. Nach dem Abfiltrieren des KClO_4 wurde mit einem Aliquot die ATP-Bestimmung nach der Hexokinase/Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemethode (69) durchgeführt.

4.2. ATP-Bestimmung durch Inkubation mit $^{32}\text{P}_i$

Inkubationsansatz: 5 ml Puffer (100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris, 0,1 mM Phosphat; pH 7,4), 4 mg kleine Partikel, 3 mg Kopplungsfaktor, 5 μMol ADP, $^{32}\text{P}_i$ (50 nMol, 750 Ci/Mol). Es wurde 15 Min. bei 25°C inkubiert. Gleichzeitig mit dem Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 1 ml 60 % HClO_4 wurden 5 μMol P_i als Träger zugesetzt und nach dem Neutralisieren mit Kaliumcarbonat und Abtrennen des KClO_4 wurde die Lösung auf Cellulose-Dünnschichtplatten mit tert. Amylalkohol-Ameisensäure-Wasser (30+20+10) chromatographiert.

5. Bestimmung des aktiven Transports

Für jeden Inkubationsansatz wurden 50 μl -Aliquote der

Membranvesikelsuspension mit Puffer (50 mM K-Phosphat, 10 mM MgSO_4 ; pH 6.6) auf 100 μl verdünnt. Nach Präinkubation für 2 Min. wurde das zu testende Substrat zugesetzt, unmittelbar danach 2,5 nMol ^3H -Prolin (500 $\mu\text{Ci}/\mu\text{Mol}$).

Die Inkubation wurde durch Verdünnen mit 5 ml des obigen Puffers gestoppt und die Suspension über ein Millipore-Filter (0,45 μ) filtriert, wobei mit weiteren 5 ml Puffer nachgewaschen wurde. Die Filter wurden in einem Probenverbrennungsapparat ("Oxymat", Intertechnique) verbrannt und die Aktivität in einem Tricarb-Liquid-Scintillation-Spektrometer (Packard) gemessen.

6. Präparationen aus E. coli

6.1. Präparation der "kleinen Partikel"

4 - 4,5 g E. coli K 12 (Merck, bei -20°C gelagert) wurden mit 20 ml Puffer (100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 10 mM Tris; pH 7,4) gewaschen, in 10 ml des gleichen Puffers aufgenommen und bei $0 - 4^\circ\text{C}$ sechsmal 30 Sek. mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier, Mod. B 12). Die intakten Zellen, größere Zellbruchstücke und die "großen Partikel" wurden durch Zentrifugieren (45 Min.) bei 39.000 g abgetrennt. Durch abermaliges Zentrifugieren bei 140.000 g (150 Min.) wurden die kleinen

Partikel gewonnen, die in 5 ml des obigen Puffers suspendiert wurden. Die Suspension enthielt ca. 8 mg Protein/ml.

6.2. Präparation des Kopplungsfaktors

Der Überstand nach der Zentrifugation bei 140.000 g wurde durch Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung fraktioniert. Aus der Fraktion, die zwischen 45 und 60 % Sättigung erhalten wurde, wurde das Ammonsulfat durch Dialyse mit einem Puffer (10 mM Tris, 10 mM $MgCl_2$; pH 7,4) abgetrennt. Das nach der Dialyse ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand in Portionen von 3 mg Protein eingefroren.

6.3. Präparation der Membranvesikel

Ca. 30 g E. coli (Merck, bei $-20^{\circ}C$ gelagert) wurden zweimal mit 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0, bei $4^{\circ}C$ gewaschen und in 2 l Puffer (30 mM Tris/HCl, 20 % Saccarose; pH 8,0, $25^{\circ}C$) suspendiert. Der Suspension wurden 7,5 g EDTA und 1 g Lysozym zugesetzt und 30 Min. bei $25^{\circ}C$ kräftig gerührt. Anschließend wurde bei 16.000 g abzentrifugiert, bis der Überstand klar war, und der Niederschlag in etwa 10 ml Puffer (0,1 M K-Phosphat, 20 mM $MgSO_4$, 20 % Saccarose; pH 6,6), wobei wegen der hohen Viskosität mit etwas DNase vorinkubiert wurde.

Für die Lyse der entstanden Protoplasten wurde mit 50

mM K-Phosphat; pH 6.6, 37°C, rasch auf das 500-fache verdünnt und 15 Min. kräftig gerührt. Nach Zusatz von EDTA-Lösung, pH 7.0, bis zur Endkonzentration von 10 mM, wurde abermals 15 Min. gerührt und schließlich, nach Zusatz von MgSO_4 bis zur Endkonzentration von 15 mM, weitere 15 Min. gerührt. Danach wurde die Suspension abzentrifugiert, bis der Überstand klar war (mind. 16.000 g, 30 Min.).

Nach Resuspension mit Hilfe von DNase in ca. 20 ml Puffer (0,1 M K-Phosphat, 10 mM EDTA; pH 6.6, 0°C) wurde eine Differentialzentrifugation bei 800 g durchgeführt, um die nicht lysierten Protoplasten abzutrennen. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und bei 45.000 g abzentrifugiert. Nach 4 - 6 Mal Waschen mit Puffer (0,1 M K-Phosphat, 10 mM EDTA; pH 6.6) wurde in 0,1 M Phosphat, pH 6.6 suspendiert, sodaß die Konzentration 4 mg Protein/ml betrug, in kleinen Aliquoten mit flüssigen Stickstoff eingefroren und in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Literaturverzeichnis

1. F.G. Hopkins, Nature (London) 40, 335 (1889).
2. H.Wieland u. Cl. Schöpf, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 2178 - 2183 (1925).
3. Cl. Schöpf u. H. Wieland, Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 2067 -2072 (1926).
4. R. Purrmann, Liebigs Ann. Chem. 544, 182 - 190 (1940).
5. H. Rembold u. W. Guyre, Angew. Chem 84, 1088 - 1099 (1972).
6. A. Butenand u. W. Schäfer in: Recent Progress in the Chemistry of Natural and Synthetic Colouring Matters. Academic Press Inc. New York 1962; S.13 - 33.
7. J. Cowperthwaite, M.M. Weber, L. Packer, S.H. Hutner, Ann. N. Y. Acad. Sci. 56, 972 - 981 (1953).
8. E.L. Patterson, H.P. Broquist, A.M. Albrecht, M.H.v.Saltza, E.L.R. Stockstad, J. Amer. chem. Soc. 77, 3167 -3168 (1955).
9. H. Rembold u. H.Metzger, Hoppe-Seyl. Z. physiol. Chem. 324, 291-292 (1962).
10. S. Kaufman, Proc. nat. Acad. Sci. 50, 1085 - 1093 (1963).
11. G. Guroff, C.A. Rhoads, J. biol. Chem. 244, 142-146 (1969).
12. A. R. Brenneman, S. Kaufman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 177-183 (1964).

13. A. Tietz, M. Lindberg, E.P. Kennedy, J. biol. Chem. 239, 4081 - 4090 (1964).
14. S. Nakamura, A. Ichiyama, O. Hayaishi, Fed. Proc. 24, 604 (1965).
15. P.M. Nair u. L.C. Vinning, Phytochemistry 4, 161 -168 (1965).
16. P.M. Nair u. C.S. Vaidyanathan, Phytochemistry 3, 235 -240 (1964).
17. B. Samuelsson, E. Granstrom u. M. Hamberg in S. Bergstroem u. B. Samuelsson: Prostaglandins, Proc. Nobel Symp., 2nd, Interscience, Stockholm 1967, S. 31 -44.
18. C. Anthony u. L.J. Zatman, Biochem J. 104, 960-969 (1967).
19. H. Rembold u. K. Buff in E. Quagliariello, S. Papa u. C.S. Rossi: Energy Transduction in Respiration and Photosynthesis. Adriatica Editrice Bari 1971, S. 467 - 472.
20. K. Buff, Dissertation, München 1971.
21. R. C. Fuller u. N.A. Nugent, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 63, 1311 - 18 (1969).
22. N. Kita, Dissertation, München 1974.
23. G. Hanser, H. Rembold, Z. Naturforsch. 23 b, 666 - 670 (1968).
24. H. Rembold u. K. Buff, Eur. J. Biochem. 28, 579-585 (1972).
25. H. Rembold u. K. Buff, Eur. J. Biochem. 28, 586-591 (1972).
26. H.S. Forrest u. C. van Baalen, Ann. Rev. Microbiol. 24, 91 - 108 (1970).
27. H. Rembold, Meth. in Enzymol. XVIII B, S. 652 - 660.

28. L. Buschmann, Dissertation, München 1963.
29. H. Rembold u. L. Buschmann, Chem. Ber. 96, 1406 - 1410 (1963).
30. M. Viscontini, R. Provenzale, S. Ohlgart u. J. Mallevialle, Helv. Chim. Acta 53, 1202 - 1207 (1970).
31. A. W. Burg u. G.M. Brown, J. Biol. Chem. 243, 2349 - 2358 (1968).
32. J. Cone u. G. Guroff, J. Biol. Chem. 246, 979-985 (1971).
33. T. Shiota, R. Jackson u. C.M. Baugh in: Chemistry and Biology of Pteridines. Herausg. K. Iwai, M. Akino, M. Goto u. Y. Iwanami. Internat. Acad. Printing Co., Tokio 1970, S. 265-279.
34. G.M. Brown in (33), S. 243 - 264.
35. M. Goto, H.S. Forrest, Biochem. Biophys. Res. Comm. 6, 180-183 (1961).
36. T. Urushibara, H.S. Forrest, Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 1189- 1193 (1970).
37. M. Viscontini, P. Bühler-Moor, Helv. Chim. Acta 51, 1548 - 1554 (1968).
38. A. Suzuki, M. Goto, J. Biochem. (Tokyo) 63, 798 - 801 (1968).
39. K. Iwai, M. Kobayashi, H. Fujisawa in (33), S. 199-207.
40. T. Urushibara, H. S. Forrest, D.S. Hoare, R.N. Patel, Biochem. J. 125, 141-146 (1971).
41. A. Suzuki, M. Goto, Biochem. Biophys. Acta 304, 222-224 (1973).
42. M. O'L. Crowe, A. Walker, Science 110, 166-168 (1949).

43. R. Tschesche, F. Vester, Chem. Ber. 86, 454-459 (1953).
44. D.L. Hatfield, C. van Baalen, H.S. Forrest, Plant Phys. 36, 240 - 243 (1961).
45. C.L. Krumdieck, Biochim. Biophys. Acta 90, 573-577 (1964).
46. M. Goto, H.S. Forrest, L.H. Dickerman, T. Urushibara, Arch. Biochem. Biophys. 111, 8-14 (1965).
47. M. Goto, K. Kobayashi, H. Sato, F. Korte, Liebigs Ann. Chem. 689, 221-228 (1965).
48. K. Kobayashi, H.S. Forrest, Biochem. Biophys. Acta 141, 642-644 (1967).
49. G. Guroff, C. A. Rhodes, J. Biol. Chem. 244, 142-146 (1969).
50. A. Suzuki, M. Goto, Bull. Chem. Soc. Japan 44, 1869-1872 (1972).
51. G.W. Kidder, V.C. Dewy, J. Biol. Chem. 243, 826-833 (1968).
52. W.S. McNutt, I. Takeda, Biochem. 8, 1370-1376 (1969).
53. M. Pouteau-Thouvenot, Bull. Ass. Diplomes Fac. Pharm. Nancy 113, 53-59 (1969).
54. L. Smith, J. Ramirez, Fed. Proc. 24, 609 (1965).
55. A. Kröger, V. Dadák, Eur. J. Biochem. 11, 328-340 (1969).
56. E.R. Kashket u. A. F. Brodie, Biochim. Biophys. Acta 78, 52-65 (1963).
57. H. R. Kaback, Biochim. Biophys. Acta, 265, 367-417 (1972).
58. A. Asano, N.S. Cohen, R.F. Baker u. A.F. Brodie,

- J. Biol. Chem. 248, 3386-3397 (1973).
59. C.W. Jones, E.R. Redfearn, Biochim. Biophys. Acta 113, 467-481 (1966).
60. W.S. Shipp, Arch. Biochem. Biophys. 150, 459-472 (1972).
61. L.C. Clark, Jr., Trans. Am. Soc. Artificial Internal Organs 2, 41-46 (1956).
62. L.C. Clark, Jr., R. Wold, D. Granger, Z. Taylor, J. Appl. Physiol. 6, 189-193 (1953).
63. H. R. Kaback, Meth. in Enzymol. XXII, S. 99-120.
64. L.P. Hager u. S. Deep, Meth. in Enzymol. X, S. 367-372.
65. G.B. Cox, N.A. Newton, F. Gibson, A.M. Snoswell u. J.A. Hamilton, Biochem. J. 117, 551-562 (1970).
66. M. Klingenberg u. A. Kröger in: E.C. Slater, Z. Kaniuga, L. Wojtczak "Biochemistry of Mitochondria," Academic Press Inc., New York 1966, S. 11-27.
67. A. Kröger u. M. Klingenberg, Biochem. Z. 344, 317-336 (1966).
68. B.D. Patterson, B. Taylor, T.J. Bowen u. F.C. Happold, Abstr. Int. Congr. Biochem., 6th, 1964 Bd. IV, S. 327 (1964).
69. W. Lamprecht u. I. Trautschold in: "Methoden der enzymatischen Analyse," Herausg. H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, 1974, Bd. 2, S. 2151-2160.

Lebenslauf

Am 10. 7. 1944 wurde ich als Sohn des Tiefbauingenieurs Rudolf Kirchmayr und der Volksschullehrerin Elfriede Heinz in Klagenfurt (Österreich) geboren. Nach dem Besuch der Volksschule trat ich 1954 in das Bundes-Realgymnasium in Klagenfurt ein, an dem ich 1962 auch die Reifeprüfung ablegte.

Vom September 1962 bis September 1963 leistete ich meinen Wehrdienst beim österreichischen Bundesheer ab und fing anschließend mit dem Studium der Chemie an der Universität Wien an. Ab Herbst 1967 studierte ich an der Universität Graz weiter, an der ich im Mai 1970 die Disser-tationsreifeprüfung ablegte.

Im Juni 1970 begann ich mit der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Herrn Professor H. Rembold. Diese Arbeit konnte ich im Dezember 1974 abschließen.

